

HUMORALE REAKTIONEN BEI RINDERN NACH MEHRMALIGEM
BESATZ MIT RHIPICEPHALUS APPENDICULATUS, HYALOMMA
ANATOLICUM EXCAVATUM UND AMBLYOMMA VARIEGATUM
SOWIE DESSEN EINFLUSS AUF DIE ZECKENENTWICKLUNG

RUTH ROSENBERG

Diss. München.
1904

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

HUMORALE REAKTIONEN BEI RINDERN NACH MEHRMALIGEM
BESATZ MIT RHIPICEPHALUS APPENDICULATUS, HYALOMMA
ANATOLICUM EXCAVATUM UND AMBLYOMMA VARIEGATUM
SOWIE DESSEN EINFLUSS AUF DIE ZECKENENTWICKLUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

vorgelegt von

Ruth Rosenberg
aus
München

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch
Korreferent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

I. Einleitung.....	1
II. Kenntnisse über humorale Reaktionen nach Infestationen von Tieren mit Schildzecken (anhand der Literatur).....	2
III. Eigene Untersuchungen.....	8
A. Material und Methoden.....	8
B. Ergebnisse.....	16
1. Veränderungen an den Zecken im Verlauf von 4 Infestationen.....	16
a) <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	16
b) <i>Hyalomma anatolicum excavatum</i>	22
c) <i>Amblyomma variegatum</i>	26
2. Serologische Untersuchungen mit dem ELISA.....	31
a) <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	31
b) <i>Hyalomma anatolicum excavatum</i>	33
c) <i>Amblyomma variegatum</i>	35
3. Intrakutantest.....	37
a) <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	37
b) <i>Hyalomma anatolicum excavatum</i>	38
c) <i>Amblyomma variegatum</i>	40
4. Passiver kutaner Anaphylaxie-Test.....	42
IV. Besprechung der Ergebnisse.....	43
V. Zusammenfassung.....	47
Summary.....	48
VI. Literaturverzeichnis.....	49
Lebenslauf	

I. Einleitung

In vielen Teilen der Welt, insbesondere in den Tropen und Subtropen verursachen Zecken durch die Übertragung zahlreicher Krankheiten erhebliche wirtschaftliche Schäden.

Die Anwendung von Akariziden zur Verringerung dieser Ektoparasiten war bisher nicht sehr erfolgreich; die häufige Applikation führte teilweise zu entsprechenden Resistenzen, außerdem sind die aufzuwendenden Kosten hoch.

Kenntnisse über die Abwehrmöglichkeiten der Wirtstiere gegenüber diesen Ektoparasiten könnten Ansätze für biologische Bekämpfungsmaßnahmen in Form einer Immunisierung und von Vakzinierungen gegen Zecken eröffnen. Derartige Methoden sind umweltfreundlich und wirtschaftlich; es könnten manche durch Zecken übertragene Krankheiten (tick borne diseases) verhindert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten die humoralen Abwehrreaktionen von Rindern nach mehrmaliger Infestation mit den Schildzecken *Rhipicephalus appendiculatus*, *Hyalomma anatolicum excavatum* und *Amblyomma variegatum* untersucht werden.

II: Kenntnisse über humorale Reaktionen nach Infestationen von Tieren mit Schildzecken
(anhand der Literatur)

Verschiedene Autoren untersuchten die Abwehrreaktionen der Wirtstiere sowie ihre Auswirkungen auf die Biologie der Zecken; dabei wurden serologische Methoden zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen Zeckenantigene angewandt.

BOWESSIDJAOU und Mitarb. (1977) beobachteten, daß bei mehrmals mit *Ixodes ricinus* besetzten Kaninchen eine Resistenz auftrat. Mit zunehmender Besatzhäufigkeit ging die Anzahl der abgefallenen repleten Weibchen zurück; auch traten verlängerte Saugdauer, geringere Gewichtszunahmen und eine Verminderung der Eiproduktion auf. Ähnliche Beobachtungen machten KÖHLER und Mitarb. (1967) bei *Hyalomma anatolicum excavatum* und *Rhipicephalus sanguineus*, die mehrmals an Kaninchen angesetzt worden waren. Ab dem zweiten Ansatz nahmen die abgefallenen repleten Weibchen und die Gelegezahl stetig ab, auch war die Schlupfzeit erheblich verlängert.

BROWN (1977) stellte bei Meerschweinchen mit *Dermacentor variabilis*-Nymphen ebenfalls eine Verringerung der Anzahl vollgesogener Zecken und eine kürzere Körperlänge nach dem zweiten Besatz fest. Er führte dies auf eine sich entwickelnde Immunität der Wirtstiere zurück. Auch bei Kälbern, die mit *Rhipicephalus appendiculatus* besetzt worden waren, trat nach dem zweiten Besatz eine Verminderung der Anzahl abgefallener vollgesogener Weibchen auf. Die Größe der Zecken war vermindert, ihre Lebensfähigkeit erschien wesentlich beeinträchtigt (LUTU, 1982).

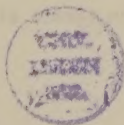
BOESE (1974) beobachtete eine Immunität bei Kaninchen nach mehrfachem Besatz mit *Haemaphysalis leporispalustris*-Nymphen. Sie trat 6-10 Tage p. i. auf, nahm bis zum 16. Tag zu und fiel dann wieder ab, falls in diesem Zeitraum keine zweite Infestation erfolgte.

Fand die zweite Infestation jedoch erst nach 20 Tagen statt, war das Tier nicht mehr immun. Eine Verkürzung der Infestationsintervalle bewirkte stärkere Immunitätsreaktionen.

Bei unterschiedlichen Wirtstieren entwickelte sich nach BRANAGAN (1974) durch wiederholte Infestation mit *Rhipicephalus appendiculatus* stets eine gleiche Immunität. Sie äußerte sich in einer verlängerten Saugzeit, der Reduzierung der Anzahl vollgesogener Zecken, der Verminderung der aufgenommenen Blutmenge und in der zunehmenden Heftigkeit der Wirtsreaktionen. Diese trat klinisch in drei Stufen in Erscheinung. Die früheste Reaktion äußerte sich als diffuse Hyperämie der Haut. 24-60 Stunden nach dem Ansaugen der Zecken war eine auffällige lokale Entzündung der Haut um die einzelnen Anheftungsstellen der Zecken festzustellen, und drei Tage, nachdem die Zecken angesogen hatten, wies die ganze Ohrmuschel eine schmerzhafte, ödematöse Beschaffenheit auf.

Beobachtungen von RUBAIRE-AKIKI (1980) erbrachten eine Abnahme des Gewichts und der Anzahl der vollgesogenen Zecken bei wiederholten Infestationen von Kaninchen mit *Rhipicephalus appendiculatus*. In ähnlicher Weise fand DITTRICH (1980) nach wiederholtem Besatz verschiedener Wirtstiere mit *Rhipicephalus appendiculatus* und *Hyalomma impressum* eine deutliche Abnahme der Abfallausbeute der Einzel- und Gelegegewichte der repleten Zecken sowie eine Verkürzung der Saugzeit der Weibchen. Diese Ausbildung einer Immunität trat bei Larven und Nymphen meist schon nach dem ersten Ansatz auf.

Schildzecken der Spezies *Haemaphysalis longicornis* hatten (FUJISAKI, 1978) ein reduziertes Körpergewicht, wenn Kaninchen einer mehrfachen Infestation mit Adulten ausgesetzt waren. Im Gegensatz zu Beobachtungen anderer Autoren war die Anzahl der abgefallenen repleten Zecken jedoch nicht vermindert. Die Saugzeit blieb ebenfalls unverändert. Die Resistenzbildung schien unabhängig von der Anzahl der pro Infestation angesetzten Zecken zu sein. Dies bestätigen WIKEL



und OSBURN (1982) , die durch einen mehrfachen Ansatz mit einer geringen Anzahl von *Dermacentor andersoni* eine Immunreaktion bei Rindern stimulieren konnten. ROBERTS und KERR (1976) stellten nach Übertragung von Rinder-Hochimmunserum gegen *Boophilus microplus* auf Kälber fest, daß die nachfolgend angesetzten Zecken zu einem geringen Prozentsatz abfielen. Das Gewicht der repleten Zecken blieb jedoch unverändert.

Die Übertragung von Serum mutmaßlich gegen *Rhipicephalus appendiculatus* resistenter Kaninchen schützte normale Kaninchen nicht wesentlich vor einer Zeckeninfestation (RUBAIRE-AKIKI und MUTINGA, 1980); allerdings waren Gewicht und Anzahl der vollgesogenen Zecken bei passiv immunisierten Tieren immer etwas niedriger als bei den Kontrollen. BROSSARD und GIRARDIN (1979) verimpften Seren von gegen *Ixodes ricinus* resistenten Kaninchen an normale Tiere; dabei konnten sie beim anschließenden Zeckenbesatz verringerte Gewichtszunahmen, verlängerte Saugperioden und verminderte Eiproduktion feststellen.

ACKERMANN und Mitarb. (1980) immunisierten Ratten subkutan mit Darmextrakt von *Dermacentor variabilis* und infestierten sie anschließend mit adulten Zecken. Dabei waren das mittlere Gewicht repleter Zecken und ihre Saugdauer vermindert. Es kam auch zu einer Verzögerung des Ansaugens der Zecken und des Ovipositionsbeginns; auch war das Gelegegewicht verringert. Ein Vergleich des Eiproduktionsindex zeigte, daß die an immunisierten Tieren gesogenen Weibchen weniger ihres Körpergewichtes in Eier umsetzten als Kontrollen.

Eine Sensibilisierung von Kaninchen durch subkutane Applikation von Larvenextrakt von *Rhipicephalus appendiculatus* (RUBAIRE-AKIKI und MUTINGA, 1980) führte zu einer signifikanten Reduzierung vollgesogener Larven bei der anschließenden Infestation. Auf Nymphen und Adulte war kein Einfluß zu bemerken. Auch mit *Dermacentor andersoni*- Speicheldrüsenantigen konnte WIKEL (1981) bei Meerschwein-

chen eine gewisse Immunität gegen Zecken induzieren. Er immunisierte vor dem Besatz mehrere Meerschweinchen vergleichend intradermal, subkutan, intraperitoneal und intramuskulär. Die erfolgreichste Methode schien die intradermale Injektion zu sein, da vollgesogene Larven und ihr Gewicht reduziert wurden.

Den Nachweis spezifischer Serumantikörper gegen Speicheldrüsen- und Darmextrakt von *Hyalomma anatolicum excavatum* und *Rhipicephalus sanguineus* nach mehrfachem Besatz von Kaninchen konnten KÖHLER und Mitarb. (1967) mit der Immundiffusion, Immunoelktrophorese und Immunofluoreszenz erbringen. Komplementbindende Antikörper gegen Speicheldrüsenextrakte von *Hyalomma anatolicum excavatum* wiesen WEILAND und EMOKPARE (1968) bei Kaninchen nach, die sie mehrfach mit dieser Zeckenart infestiert hatten. 4-6 Wochen nach Versuchsbeginn traten Maximaltiter von 1:10 - 1:320 auf. 8 Wochen nach dem letzten Besatz waren Antikörpertiter nicht mehr nachweisbar. Bei erneutem Besatz der Tiere mit *Rhipicephalus sanguineus* trat zwar eine Antikörperbildung auf, sie war jedoch wesentlich niedriger als bei *Hyalomma anatolicum excavatum*.

BOWESSIDJAOU und Mitarb. (1977) fanden bei Kaninchen mit Hilfe der indirekten Immundiffusion Antikörpertiter gegen *Ixodes ricinus*-Speichel gegen Ende des ersten Besatzes; er erhöhte sich bis zum vierten Besatz nicht weiter.

Mit der Agar-gel-Diffusion konnten in Seren von Kaninchen, die mehrfach mit *Haemaphysalis longicornis* infestiert waren, präzipitierende Antikörper gegen Gesamtzeckenextrakte nachgewiesen werden (FUJISAKI, 1978). Sie traten erstmals nach der ersten oder zweiten Infestation auf, blieben jedoch nur kurze Zeit nachweisbar. Bei weiteren Infestationen wurde die Reaktion heftiger; allerdings hatte die Anzahl der Zecken pro Besatz keinen Einfluß auf die Antikörpertiterhöhe.

Bei Kaninchen traten nach einer zweiten Infestation mit *Rhipicephalus appendiculatus* in der Immundiffusion präzipitierende Antikörper gegen Gesamtzeckenextrakte von Nymphen und Adulten auf (RUBAIRE-AKIKI und MUTINGA, 1980). Auch bei Kälbern konnten WIKEL und OSBURN (1982) eine Präzipitationsreaktion auf Speicheldrüsenantigen (*Dermacentor andersoni*) nach allen vier Ansätzen nachweisen.

BROSSARD (1977) beobachtete nach Übertragung von Immunserum auf Kaninchen bereits 4 Stunden nach der Injektion einen Anstieg des Antikörpertiters in der indirekten Immundiffusion; die Kontrolltiere reagierten erst 5 Tage nach der Infestation mit *Ixodes ricinus* mit einem schwachen Titeranstieg.

BROSSARD und GIRARDIN (1979) bestimmten die Hautsensibilität von Kaninchen mit dem direkten Kutantest. Nach der intradermalen Injektion von Speicheldrüsenantigen von *Ixodes ricinus* zeigte sich eine lokale Überempfindlichkeit vom Soforttyp. Beim Rinde versuchten WILLADSEN und WILLIAMS (1976) den Intradermaltest durch Injektion von Larvenextrakt von *Boophilus microplus*; 20-30 Minuten p. i. trat eine ödematöse Schwellung auf. Ähnliche Ergebnisse erreichten WILLADSEN und Mitarb. (1978) durch die Applikation von Larvenextrakt der gleichen Zeckenart in verschiedenen Konzentrationen.

Speicheldrüsenantigen von *Dermacentor andersoni* ergab bei Meerschweinchen 7 Tage nach der zweiten Infestation mit Larven und bei den Kontrollen eine leichte Sofortreaktion. Nach 24 Stunden war die Haut der resistenten Tiere dreimal dicker als die der Kontrollen, und nach 72 Stunden war die Reaktion abgeklungen (WIKEL und Mitarb., 1978). Die gleiche Zeckenart ergab bei Rindern eine Sofortreaktion nach 30-60 Minuten und eine Spätreaktion nach 24 Stunden. Sie war bei Tieren mit nur einer Infestation am schwächsten, verstärkte sich aber nicht proportional zur Anzahl der Ansätze (WIKEL und OSBURN,

1982). CHINERY (1981) verglich die Hautveränderungen um saugende Zecken und um Injektionsstellen von Histamin und Speicheldrüsenextrakte von *Haemaphysalis spinigera* und *Rhipicephalus sanguineus* bei sensibilisierten und normalen Kaninchen. Der maximale Durchmesser der Hautveränderungen bei der sensibilisierten Gruppe war bedeutend größer als derjenige der Kontrollen.

Mit dem passiven kutanen Anaphylaxie-(PCA)Test konnte BOESE (1974) eine durch homozytotrope Antikörper vermittelte Sofortreaktion bei Kaninchen nachweisen. Nach mehreren Infestationen mit *Haemaphysalis leporispalustris* injizierte er anderen Kaninchen das Serum der ersten Gruppe (Test-Serum), normales Serum sowie antikörperhaltiges Kaninchenserum an verschiedenen Stellen des Rückens intradermal. Als Antigen verwendete er Gesamtextrakt aus ungesogenen Zeckenweibchen.

Auch RUBAIRE-AKIKI und MUTINGA (1980) wiesen bei mit *Rhipicephalus appendiculatus* infestierten Kaninchen mit Hilfe des PCA-Tests homozytotrope Antikörper nach der 3. Larveninfestation und der zweiten Nymphen- und Adulteninfestation nach. Als Antigen verwandten sie Gesamtextrakt von Larven und Nymphen und Speichelsekret von Adulten.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

Als Infestationsmaterial dienten Adulte von *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1974), *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch, 1844) und *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann, 1901). Die Zecken wurden in Rollrandgläschen im Brutschrank bei 28°C und 85-90% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Als Wirtstiere für die Züchtung von Adulten verwendete ich Kaninchen und Fleckviehrinder, die vorher keinen Kontakt mit Zecken hatten. Das Alter der zu den Versuchen verwendeten Zecken betrug 1-8 Monate. Vor jedem Ansatz wurden sie gepoolt und anschließend in Gruppen aufgeteilt, um für jedes Tier gleichwertiges Infestationsmaterial sicherzustellen.

Die Untersuchungen wurden an 9 schwarzbunten Kälbern beiderlei Geschlechts im Alter von 5-7 Monaten durchgeführt. Sie hatten bisher keinen Kontakt mit den benutzten Zeckenarten. Um zu vermeiden, daß die Kälber die auf dem Rücken saugenden Zecken zerstörten, wurden sie einzeln aufgestellt und mit zwei Halftern beiderseits so fixiert, daß sie mit dem Kopf den Rücken nicht mehr erreichen konnten.

Die Tiere erhielten Kälberkorn SP und Haferflocken 1x täglich, Heu 2x täglich und Wasser ad libitum. Der Versuch wurde in 3 Durchgängen durchgeführt. Jeweils 3 Kälber wurden mit einer Zeckenart besetzt. Auf jedem Kalb erfolgten 4 Ansätze im Abstand von jeweils 14 Tagen.

Um die Zecken gezielt ansetzen und die abgefallenen Weibchen abnehmen zu können, wurden, wie bereits bei ERNST (1981) beschrieben, einen Tag vor dem Ansatz Beutel auf die Rücken der Tiere geklebt. Sie bestanden aus Baumwollstoff und einem ca. 4 cm breiten Kleberand am unteren Ende. Sie waren ca. 20 cm hoch und wurden mit einem Gummiring verschlossen. Die Haare an der zu besetzenden Stelle wurden geschoren. Zum Aufkleben der Beutel wurde Kontaktkleber Fast-

bond 10 von Fa. 3M verwendet.

Bei *Hyalomma anatolicum excavatum* wurden vor jedem Ansatz neue Beutel aufgeklebt; bei den anderen Arten wurden die Beutel teilweise für 2-3 Ansätze benutzt.

Pro Ansatz und Rind wurden jeweils 100 Männchen und 100 Weibchen von *H. a. excavatum* und *R. appendiculatus* sowie 50 Männchen und 50 Weibchen von *A. variegatum* verwendet. Die Männchen von *A. variegatum* wurden, da sie nach CENTURIER und KLIMA (1978/79) einige Tage saugen müssen, um für die Weibchen attraktiver zu werden, jeweils 4 Tage vorher angesetzt.

Gegen Ende der Saugezeit wurden die Beutel täglich kontrolliert und vollgesogene Weibchen abgesammelt. Diese wurden anschließend einzeln gewogen und, um die Gelegegewichte zu ermitteln, in Anlehnung an die von ERNST (1981) beschriebene Methode derart gelagert, daß eine spätere Trennung von ihren Eiern möglich wurde. Zu diesem Zweck bereitete ich belüftbare Kunststoffdosen von 20 cm Länge, 10 cm Breite und 6,5 cm Höhe vor. In jede Dose verbrachte ich gekennzeichnete und gewogene Gläschen (43 mm Höhe, 30 mm Durchmesser). Mittels Zellstoffstreifen wurden sie am Verrutschen verhindert. Die Deckelinnenseite bedeckte ich vollständig mit doppelbeschichtetem Klebeband und kennzeichnete sie genau über der Mitte der Gläschen. Die abgefallenen Weibchen wurden so mit dem Rücken auf dem Klebeband befestigt, daß sich ihre Geschlechtsöffnungen über der Gläschenmitte befanden. Diese Dosen wurden bei 28°C und 85-90% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ich führte täglich eine Kontrolle von Beginn und Ende der Oviposition sowie des Schlupfbeginns durch.

Um Antigenmaterial für die serologische Untersuchung, den PCA- und Intrakutantest zu gewinnen, präparierte ich Speicheldrüsen von adulten Zecken. *R. appendiculatus*- und *H. a. excavatum*-Adulte wurden zu diesem Zweck an Kaninchenohren, *A. variegatum* auf dem Rücken von Fleckviehkälbern mittels der oben beschriebenen Methode gefüttert.

Um die Antigenität der Speicheldrüsen nach verschiedenen Saugzeiten prüfen zu können, wurden 6 Gruppen gebildet. Gruppe 1-5 bestand aus Speicheldrüsen von Weibchen, die nach 12 Stunden sowie 1,2,3-5 und 6-8 Tagen Saugzeit abgenommen und präpariert wurden. Die sechste Gruppe bestand aus Männchen mit unterschiedlichen Saugzeiten. Für jede Gruppe waren 50-60 Zecken je Test nötig

Für die Speicheldrüsenpräparation wurden die Zecken auf einer mit Paraffin gefüllten Petrischale mit 2 Insektennadeln am Vorder- und Hinterende derart fixiert, daß die Ventralseite nach unten zu liegen kam. Mit einer Augenschere wurde von der ersten Coxa ausgehend über caudal ein Schnitt entlang der lateralen Körperdecke bis zur ersten Coxa der gegenüberliegenden Seite durchgeführt.

Die dorsale Körperdecke wurde anschließend nach oben geklappt, von anhaftenden Eingeweideteilen befreit und mit einer Insektennadel auf dem Paraffin befestigt. Nach Entfernung der oben liegenden Darmteile war die Speicheldrüse in ihren gesamten Anteilen gut sichtbar. Ich entfernte sie vorsichtig mit Hilfe von 2 feinen Pinzetten. Bis eine genügende Anzahl von Speicheldrüsen präpariert war, legte ich sie in ein gekühltes Lymphschälchen mit PBS pH 7,2. Nach dem Entfernen von restlichen Tracheen- und Darmteilen wurden die Speicheldrüsen in eine ca. einen Tropfen PBS pH 7,2 enthaltenden Microtube gefüllt und bei -25°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

Zur Antigengewinnung für die serologische Untersuchung wurden Speicheldrüsen von Weibchen verschiedener Saugstadien gemeinsam verwendet. Sie wurden in einem Glashomogenisator der Fa. Colora 20 Minuten homogenisiert und währenddessen gekühlt. Anschließend wurde soviel PBS pH 7,2 hinzugefügt, daß auf 1 ml Flüssigkeit 30 Speicheldrüsen von *H. a. excavatum* bzw. *R. appendiculatus* kamen. Bei *A. variegatum* wurde die Menge auf 15 Speicheldrüsen pro ml reduziert, da sie besonders große Speicheldrüsen aufwiesen.

Das Homogenat wurde mit Hilfe eines Magnetrührers über Nacht bei

+4° C extrahiert und am nächsten Tag bei 1700g/Min 30 Minuten lang zentrifugiert. Von dem Überstand entnahm ich 0,05 ml, um eine Proteinbestimmung durchzuführen. Dazu wendete ich die Methode Folin-Ciocalteu modifiziert nach Lowry an. Den restlichen Überstand fror ich in Portionen zu 0,2 ml in Microtubes bei -25°C ein.

Antigenmaterial für den PCA- und den Intrakutantest wurde ebenfalls aus Speicheldrüsen gewonnen, jedoch unterschied sich die Aufbereitung in einigen wesentlichen Punkten von der oben beschriebenen Methode. So wurden für jede Zeckenart 6 Antigengruppen entsprechend der 5 verschiedenen Saugzeiten der Weibchen und der Männchen getrennt verarbeitet. Die zugesetzte Flüssigkeit bestand aus Aqua dest. und das Homogenisieren dauerte nur 3 Minuten. Das Homogenat wurde in einer Kältemischung (96%-iger Äthanol mit Trockeneis) zweimal eingefroren und wieder aufgetaut und anschließend bei +4°C und 105000 g/Min. 90 Minuten zentrifugiert. Von dem Überstand führte ich die bereits oben genannte Proteinbestimmung durch; der Rest wurde in mehrere Portionen aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.

Für die serologische Untersuchung entnahm ich den Kälbern während des Versuches laufend Blut und gewann daraus das Serum. Dazu wurde die Probe 1-2 Stunden bei Raumtemperatur zur Gerinnung stehen gelassen, danach bei 2500 g/Min. 10 Minuten zentrifugiert und das Serum portionsweise in Mikrotubes abgefüllt. Diese wurden dann bei -25°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Die Entnahme erfolgte in den ersten 4-6 Wochen 2x wöchentlich, später nur noch 1x pro Woche bis etwa zum 120. Versuchstag. Serum, das vor Ansatz der Zecken gewonnen wurde, diente als Negativkontrolle.

Zum Serumantikörpernachweis verwendete ich den Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), als Antigen den bereits vorbereiteten Überstand des Speicheldrüsenextraktes der jeweiligen Zeckenart. Im Vorversuch testete ich mit Hilfe der Schachbrett-Titration die op-

timale Antigenverdünnung. Um einen ungefähren Titerverlauf angeben zu können, wurden die Negativseren und Seren, die kurz nach dem 2. und 4. Ansatz entnommen wurden, verwendet.

Ferner benutzte ich eine mit Puffer pH 9,6 (Zusammensetzung: 1,59 g Na_2CO_3 - zuerst lösen, 2,93 g NaHCO_3 , Aqua dest. ad 1l) verdünnte Antigenlösung, von der ich in jede Vertiefung der Reihe 2 der jeweiligen Platte 200 μl einfüllte. Die Anfangskonzentration des Antigens betrug 100 $\mu\text{g/ml}$. In die restlichen Vertiefungen wurden Puffer vorgelegt und mit der Multipipette in Längsrichtung der Platte mehrere Verdünnungsstufen angelegt, so daß die Proteinkonzentrationen des Antigens der Reihen 1-10, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,1, 1,5, 0,75 und 0,37 $\mu\text{g/ml}$ betrugen. Anschließend wurden die Platten bei 37°C im Wasserbad für 3 Stunden inkubiert und nach Lagerung bei +4°C über Nacht mit Leitungswasser und PBS-Tween gewaschen.

Von einer PBS-HSA-Lösung (PBS pH 7,2 mit 0,5% Humanserumalbumin) wurde zur Vermeidung unspezifischer Anlagerungen von Serumproteinen 0,05 ml in jede Vertiefung und 0,075 ml in Reihe H pipettiert. Diese Reihe erhielt zusätzlich 0,025 ml des im Verhältnis 1:4 mit PBS-HSA-Lösung vorverdünnten Serums. Mit einem 0,05 ml Mikrodiluter (Fa. Dynatech) wurden 8 Verdünnungsreihen (1:8, 1:16 usw. bis 1:512) in Querrichtung der Platte angelegt. Das hier verwendete Serum bestand aus einem Serumpool von jeweils 3 mit einer Zeckenart besetzten Kälbern.

Nach Inkubation der Platten für eine Stunde bei +37°C auf einem Taumelgerät wurden sie erneut gewaschen. Das Antiglobulin (Peroxidase Conjugated IgG Fraction Rabbit Anti-Bovine IgG der Fa. Cappel) wurde mit 4%-iger HSA-PBS-Lösung verdünnt und davon 0,05 ml in jede Vertiefung eingefüllt.

Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 37°C für eine Stunde und der oben beschriebene Waschvorgang. Anschließend füllte ich in jede Vertiefung 0,1 ml Substrat (5-Amino-Salicylsäure) ein. Nach einer Stunde Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde die Extinktion mit Hilfe des Titer - Multiskan (Fa. Dynatech) bei 450 nm gemessen.

Um eine feinere Abstufung der Serumtiter zwischen positiven und negativen Werten zu erreichen, testete ich die Methode des ELISA in verschiedenen Ansätzen. So benutzte ich Platten der Fa. Dynatech und Fa. Kontron parallel. Um die Serumtiter der Verdünnungsstufen 1:1024 und 1:2048 noch miterfassen zu können, wurde die Serumverdünnung auf 1:16 geändert und verschiedene Konjugatverdünnungen (1:1000; 1:1500; 1:2000) angewendet. Weiterhin testete ich die drei verschiedenen Serumpools auf einer Platte mit einer jeweiligen Antigenverdünnung von 10, 5, 2.5 und 1.25 $\mu\text{g/ml}$.

Aufgrund der Ergebnisse des Versuchs wählte ich im Hauptversuch Mikrotiterplatten der Fa. Kontron, eine Antigenkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$, Konjugatverdünnung von 1:2000 und Seren in einer Verdünnung von 1:100. Zur Beschichtung der Platten füllte ich in jede Vertiefung 0,05 ml des vorverdünnten Serums.

Da jede Vertiefung ein Serum eines Versuchstages enthielt, konnten auf diese Weise auf einer Platte alle Seren der 3 Kälber, die mit der jeweiligen Zeckenart infestiert worden waren, ausgetestet werden. Insgesamt waren es 22-26 Seren pro Tier. Es folgte eine Stunde Inkubation bei 37°C mit nachfolgendem Waschen mit Leitungswasser und PBS-Tween. Von dem verdünnten Konjugat wurden 0,05 ml pro Vertiefung eingefüllt. Die weitere Behandlung erfolgte wie im Vorversuch.

Bei allen Rindern wurde 4-6 Wochen nach dem letzten Besatz mit den Speicheldrüsenantigenen der entsprechenden Zeckenart ein Intradermaltest durchgeführt. Die Tiere wurden seitlich an der Schulter-Halsregion geschoren und pro Tier 13 Injektionen markiert. Unmittelbar vor Testbeginn wurde die Hautdicke jeder Injektionsstelle mit einem Kutimeter gemessen. Jedes Antigen wurde zweimal getestet, einmal unverdünnt und einmal in einer Verdünnung von 1:10 mit Aqua dest. Zur Kontrolle diente ebenfalls Aqua dest. Pro Tier und Injektionsstelle wurden 0,1 ml Antigen intradermal verwendet.

Zur Feststellung einer eintretenden Reaktion wurde die Hautdicke nach 30 Minuten, 24, 48, 72 sowie 96 Stunden mit dem Kutimeter gemessen. Reaktionen, die eine Dickenzunahme von 0,2 cm und darüber anzeigten, wurden als positiv bewertet.

Zum Nachweis homozytotroper Antikörper führte ich einen heterologen passiven kutanen Anaphylaxie (PCA-) Test durch. Den ersten Versuch unternahm ich bei weißen Mäusen, die in Gruppen zu je 6 Tieren eingeteilt und zunächst in Narkose gelegt wurden. Dazu verdünnte ich Pentobarbital (Nembutal^R) im Verhältnis 1:10 mit 0,9%-iger NaCl-Lösung und gab davon 0,2-0,25 ml pro Tier i. p. Anschließend wurden die Tiere auf dem Rücken geschoren.

In Anlehnung an die Methode von ZAHNER (mündl. Mitt.) markierte ich 7 Felder auf der geschorenen Stelle und injizierte in 6 davon jeweils ein Serum intrakutan. In das 7. Feld setzte ich eine Kontrollinjektion mit PBS-pH 7,2. Bei den verwendeten Seren handelte es sich um solche, die den Kälbern vor dem Zeckenansatz, kurz nach dem 1., 2. und 3. Ansatz sowie 4 Wochen nach dem 4. Besatz entnommen worden waren.

Als Antigen verwandte ich Speicheldrüsenextrakte von *H. a. excavatum* und *R. appendiculatus*. Nach einer Latenzzeit von 2 bzw. 3 Tagen injizierte ich den Tieren 0,18 ml Antigen mit 0,02 ml 6%-iger Evans-blue Lösung i. v. in die Schwanzvene. Jede Maus erhielt ein Antigen mit einer anderen Saugzeit. Ich kontrollierte die Tiere nach 30 Minuten; nach 60 Minuten tötete ich sie und untersuchte die Haut von der Innenseite. Als positiv wurde ein blauer Farbfleck an der Seruminjektionsstelle bewertet.

Einen weiteren Versuch führte ich bei einer Zwergziege mit einem Körpergewicht von 9,3 kg durch. Dabei ging ich nach der Methode von GERSHWIN (1980) vor. Um eine Reaktion beurteilen zu können, achtete ich darauf, daß die getestete Ziege eine genügend große weiße Fläche aufwies. Es wurden ihr seitlich von der Schulter bis zum Becken die Haare geschoren und 21 Injektionsstellen markiert. Als Testserum verwendete ich 6 Seren von den Versuchstagen 0, 8, 22, 44, 71 und 85 eines Rindes, das mit *H. a. excavatum*-Adulten mehrmals infestiert worden war. Um die Reaktio-

nen nach verschiedenen Zeitabständen zwischen Serum- und Antigenapplikation testen zu können, injizierte ich an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 0,2 ml von jedem dieser 6 Seren und von einer Kontrolle mit PBS pH 7,2 intrakutan. Als Antigen wählte ich den Speicheldrüsenextrakt von *H. a. excavatum*, der mit 4,22 mg/ml den höchsten Proteingehalt aufwies. 6 Stunden nach der letzten Seruminjektion verabreichte ich dem Tier 5 ml einer Mischinjektion von 2%-iger Evans-blue-Lösung mit 1,8 ml der besagten Antigenlösung intravenös.

Die Injektionsstellen wurden nach 60 Minuten kontrolliert; positive Reaktionen in Form von Blaufärbungen wurden mit einem Lineal vermessen.

B. Ergebnisse

1. Veränderungen an den Zecken im Verlauf von 4 Infestationen

a) Rhipicephalus appendiculatus .

Ich setzte an 3 Kälber je 100 Paare pro Ansatz an. Davon fielen beim

1. Ansatz 56,7%, beim 2. Ansatz 58,7%, beim 3. Ansatz 72,3% und beim
4. Ansatz nur noch 21,3% Weibchen ab.

Um eine Änderung in der Verteilung der Gewichte der repleten Weibchen, bezogen auf die Gesamtzahl der abgefallenen Weibchen, darstellen zu können, wurden alle Zecken einzeln gewogen und in 7 Gewichtsklassen eingeteilt (Tab. 1).

Die erste Klasse mit Zecken von 0,001-0,100g Körpergewicht ist erst ab dem zweiten Ansatz vertreten und nimmt anteilmäßig bis zum 4. Ansatz stetig zu. Die nächste Klasse erreicht ihr Maximum ebenfalls beim 4. Ansatz. Der Anteil der Zecken von 0,201-0,300g nimmt bis zum 3. Ansatz zu und bleibt konstant. Er stellt ab dem 2. Besatz die größte Gruppe dar. Alle übrigen Gewichtsklassen nehmen bis zum 4. Ansatz ab. Dabei ist zu bemerken, daß die 6. Klasse ab dem 3. und die 7. Klasse vom 2. Ansatz an nicht mehr vertreten sind.

Insgesamt kann festgestellt werden, daß die Anzahl der Zecken mit einem Gewicht von 0,301-0,700g im Verlauf der 4 Infestationen stark zurückgeht, während der Anteil der Weibchen mit 0,001-0,200g zunimmt. Zecken mit einem Gewicht von 0,301-0,400g treten zahlenmäßig nur beim ersten Ansatz als größte Gruppe auf. Bei den übrigen Ansätzen dominiert die Klasse 0,201-0,300.

Gewicht (g)	Ansatz							
	1		2		3		4	
	Zahl	%	Zahl	%	Zahl	%	Zahl	%
0,001 - 0,100			3	1,7	9	4,2	10	15,6
0,101 - 0,200	1	0,5	11	6,3	17	7,8	14	21,9
0,201 - 0,300	28	16,5	73	41,5	105	48,4	31	48,4
0,301 - 0,400	87	51,1	71	40,3	79	36,4	8	12,5
0,401 - 0,500	38	22,3	16	9,1	7	3,2	1	1,6
0,501 - 0,600	15	8,8	2	1,1				
0,601 - 0,700	2	1,1						
Gesamt	170		176		217		64	

Tab. 1: Zuordnung repleter *Rhipicephalus appendiculatus*-Weibchen zu Gewichtsklassen und prozentualer Verteilung (Summierte Werte von 3 Rindern)

Die geringe Anzahl der abgefallenen Weibchen beim 4. Ansatz ist darauf zurückzuführen, daß sich die Rinder mit zunehmender Besatzhäufigkeit beunruhigt zeigten; dadurch erhöhte sich die Menge der zerquetschten vollgesogenen Weibchen. Während es beim 1. Ansatz 0,6% und beim zweiten 4,9% waren, wurden beim dritten Ansatz 9,2% und beim vierten 27,3% tote Weibchen gefunden. Diese Menge war mit Sicherheit besonders beim 3. und 4. Ansatz größer; es war jedoch nicht möglich, weitere tote Zecken aus der in den Beuteln angetrockneten Masse von Blut und Exsudat zu isolieren.

Von den angesetzten Zecken hatten bis auf einzelne alle innerhalb von 6-12 Stunden angesogen. Die mittlere Saugdauer ist in Abb. 1 aufgeführt. Beim 2. Ansatz trat bei allen Rindern eine wesentlich kürzere Saugzeit auf; diese stieg bei den weiteren Ansätzen wieder leicht an, erreichte aber den Ausgangswert nicht mehr. Die Differenz zwischen 1. und 4. Ansatz beträgt im Durchschnitt 1,3 Tage.

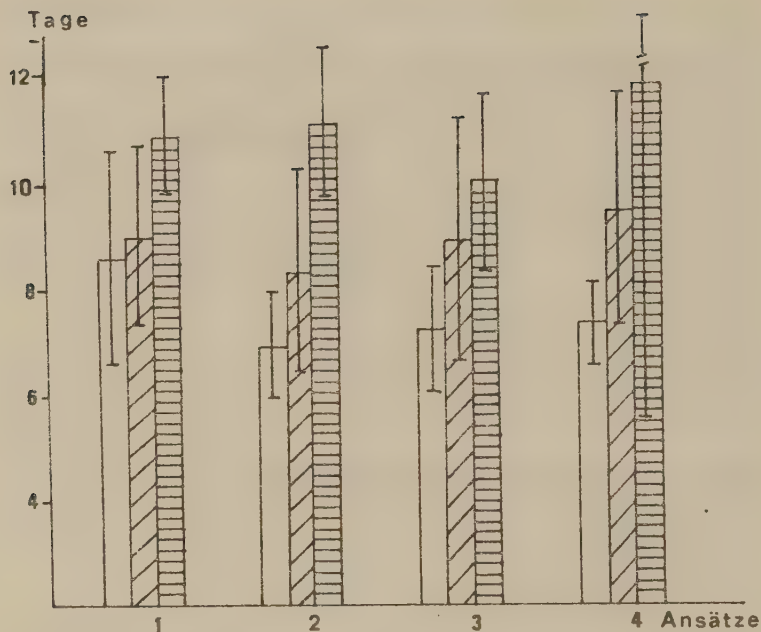


Abb. 1: Saugdauer der Weibchen von *R. appendiculatus*, *H. a. excavatum* und *A. variegatum* im Laufe von 4 Ansätzen (Durchschnittswerte von je 3 Rindern)

- Rhipicephalus appendiculatus*
- Hyalomma a. excavatum*
- Amblyomma variegatum*

Das durchschnittliche Abfallgewicht (Tab. 2) nimmt im Verlauf der 4 Ansätze stetig ab. Eine Ausnahme bilden hierbei die Zecken von Rind Nr. 1, die im 2. Ansatz eine geringfügige Zunahme zeigen. Das gemeinsame mittlere Abfallgewicht der Zecken der 3 Rinder liegt beim 4. Ansatz um 44% niedriger als beim

ersten. Bei den abgefallenen Zecken fiel schon grobsinnlich auf, daß ihre Körpergröße und ihr Fullzustand ab dem 2. Ansatz abgenommen hatten.

Ansatz	n	$\bar{x}$	s
1	170	0,3766	0,0875
2	176	0,3040	0,0776
3	217	0,2760	0,0771
4	64	0,2107	0,0882

Tab. 2: Abfallgewichte von *R. appendiculatus* - Weibchen im Verlauf von 4 Ansätzen (Durchschnittswerte von 3 Rindern)

Der Zeitraum vom Abfalltag der Weibchen bis zum Beginn der Oviposition weist nur geringfügige Veränderungen auf. Während nur bei einem Rind eine stetige Verlängerung bis zu 1,6 Tagen (4. Ansatz) auftrat, war der Verlauf bei den anderen Tieren unregelmäßig. Die Durchschnittswerte zeigen eine Verlängerung um 0,3 Tage beim 2. und um weitere 0,4 Tage beim 4. Ansatz.

Die Anzahl der Weibchen, die keine Eier legten, betrug beim 1. Ansatz 4,7%, beim 2. 4,5%, beim 3. 5,1% sowie beim 4. Ansatz 4,7% der abgefallenen lebenden Zecken. Bei diesen stellte ich harzige Verklebungen des Genitalporus und teilweise der Mundwerkzeuge fest. Nach 1-2 Wochen färbten sich diese Weibchen dunkel und starben.

Die Ovipositionsdauer nahm im Laufe der Ansätze zu und war am längsten bei Zecken, die im 3. Besatz gesogen hatten (Abb. 2). Im 4. Ansatz war die Ovipositionsdauer wieder etwas kürzer, blieb jedoch im Durchschnitt um 0,5 Tage über dem 1. Ansatz.

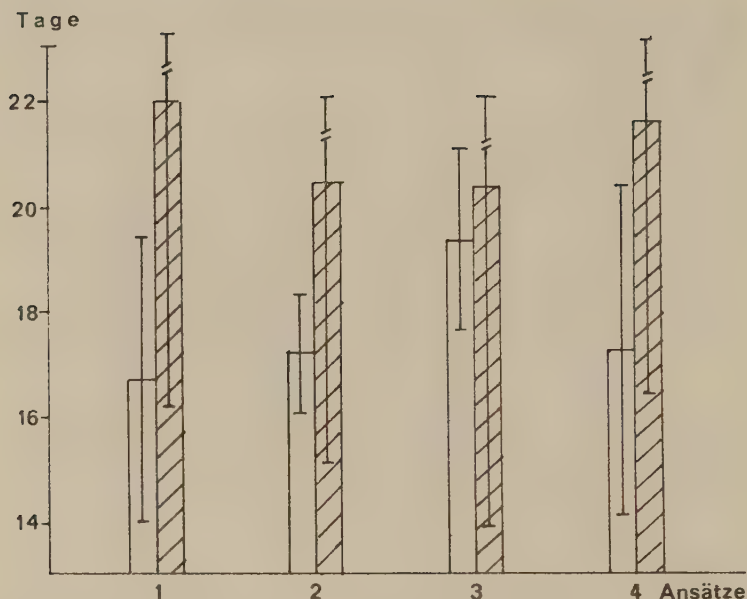


Abb. 2: Ovipositionsdauer von *R. appendiculatus*- und *H. a. excavatum*-Weibchen im Verlauf von 4 Ansätzen (Durchschnittswerte von jeweils 3 Rindern)

 *Rhipicephalus appendiculatus*
 *Hyalomma a. excavatum*

Das Gewicht der von den Zecken der verschiedenen Ansätze abgelegten Eier zeigt deutliche Veränderung im Laufe des Versuches. Das durchschnittliche Gelegegewicht liegt im 1. Ansatz bei 0,1609 g, erreicht beim 4. Ansatz den niedrigsten Wert mit 0,0972 g und ist dann 0,0637 g geringer als beim ersten. Der Eiproduktionsindex (Tab. 3) nach ACKERMANN und Mitarb. (1980) gibt den prozentualen Anteil des Geleges am Körpergewicht der vollgesogenen Zecke wieder und wird nach der Formel

$$\frac{\text{Gelegegewicht}}{\text{Gewicht repleter Zecke}} \times 100\%$$

berechnet. Nur bei Rind Nr. 1 ist anfänglich ein Rückgang zu verzeichnen; bei allen anderen sowie auch in der Auswertung der Durchschnittswerte von 3 Rindern tritt beim 2. und 3. Ansatz eine Zu- und eine Abnahme sowie beim 4. Ansatz wieder ein Anstieg des Eiproduktionsindex auf.

Zeckenart	Eiproduktionsindex (%) bei Ansatz			
	1	2	3	4
R. appendiculatus	42,7	46,3	43,9	46,1
H. a. excavatum	44,3	42,7	37,3	37,1
A. variegatum	45,3	38,3	36,3	38,1

Tab. 3: Eiproduktionsindex von R. appendiculatus-, H. a. excavatum- und A. variegatum-Weibchen (Durchschnittswerte von je 3 Rindern)

Die Zeitspanne von Ovipositionsende bis zum Schlupf der ersten Larven unterliegt erheblichen Schwankungen (Abb.3). So erfolgte der Schlupfbeginn in Gelögen vom 2. Ansatz im Schnitt um 1,3 Tage früher als beim ersten, im 3. Ansatz 3 Tage früher als beim zweiten. Im 4. Ansatz beginnt der Schlupf 2,6 Tage später als im dritten und 1,7 Tage früher als im ersten Ansatz. Der Anteil der vertrockneten Gelege an der Anzahl der geschlüpfen betrug vom 1.-4. Ansatz 8.6, 6.6, 6.4 sowie 3.3%.

b) Hyalomma a. excavatum

Auch bei Hyalomma a. excavatum setzte ich pro Kalb 100 Tastre an. Davon fielen nach dem ersten Ansatz 11,7%, nach dem zweiten 40,1%, nach dem dritten 50,8 und nach dem 4. Ansatz 38,7% complete Weibchen ab.

Da bei den Kalbern insbesondere bei den 2. - 4. Ansätzen starke Hautreaktionen und dadurch bedingt erhebliche Exsudatmassen auftraten, war es leider nicht möglich, die Anzahl der vollgesehenen, zerquetschten Zecken zu bestimmen.

Bei der Verteilung der abgetöteten vollgesehenen Weibchen auf die Gewichtsklassen finden im Laufe der Ansätze erhebliche Veränderungen auf. So sind im ersten Ansatz 8% der Zecken 0,81 - 1,40 g schwer, im zweiten mit einem Gewicht von 0,01 - 0,40 g sind überhaupt nicht vertreten. Im zweiten Ansatz ist der Anteil der Zecken von 2,01 - 2,80 g bereits auf 6% anwesenden. Diese Tendenz hält im 3. Ansatz weiter von (20,2%). Im vierten Ansatz sind immer noch einige besonders große Exemplare anwesenden, jedoch ist der Prozentsatz der Zecken mit 2,81 - 3,40 g Körpergewicht auf 14,1% zurückgegangen (Tab. 4).

Nach 12 Stunden hatten bis auf wenige Ausnahmen alle anwesenden Zecken abgeworfen. Der Abfallzeitpunkt änderte sich während der 3. Inzestation im Durchschnitt nicht wesentlich (Abb. 1). Die mittlere Stadiumdauer der abgetöteten complete Weibchen veränderte sich von 4 Tagen beim 2. Ansatz auf 8,3, beim dritten auf 8,6, und im 4. Ansatz auf 9,4 Tage anzusteigen (Abb. 1).

Gewicht (g)	Ansatz							
	1		2		3		4	
	Zahl	%	Zahl	%	Zahl	%	Zahl	%
0,01 - 0,20			10	6,9	8	4,7	9	7,8
0,21 - 0,40			14	9,7	28	16,6	10	8,8
0,41 - 0,60	6	4,4	34	23,4	32	18,9	36	31,6
0,61 - 0,80	12	10,6	29	20,0	46	26,0	28	24,5
0,81 - 1,00	47	41,6	31	21,4	42	24,9	20	17,7
1,01 - 1,20	40	35,4	23	15,9	10	7,7	6	5,2
1,21 - 1,40	9	8,0	4	2,7	2	1,2	2	1,7
Gesamt	113		146		169		116	

Tab. 4: Zuordnung des Alter Hydrome d. excretum-Wasser zu Gewichtsklassen und prozentualer Verteilung (Zusammensetzung von 3 Rindern)

Bereits grobannähernd fiel auf, daß die Zuckerkasse des 1. & 2. Besätzes kleiner und weniger prall gefüllt waren. Das mittlere Gewicht der im 1. gesaugenen Weibchen des ersten Ansatzes betrug 0,3595 g. Im zweiten Ansatz war es bereits um 32,7% erniedrigt, dann trat eine Zunahme von 2,1% auf. Im 4. Ansatz betrug die Differenz der Zuckergewichte zum ersten Ansatz 36,6%.

Ansatz	n	$\bar{x}$	s
1	113	0,3595	0,1725
2	146	0,5467	0,4626
3	169	0,5658	0,2674
4	116	0,5130	0,2692

Tab. 5: Abfallgewichte von H. d. excretum im Verlauf von 4 Ansätzen (Durchschnittswerte von 3 Rindern)

Der Zeitraum von Abfalltag bis Ovipositionsbeginn ist wesentlich länger als bei *Rhipicephalus appendiculatus* und unterliegt im Verlauf der Besätze unterschiedlichen Schwankungen, die keine Beziehung zur Besatzhäufigkeit erkennen lassen. So begannen die Weibchen vom 1. Besatz nach durchschnittlich 40 Tagen mit der Eiablage, diejenigen des 2. Ansatzes dagegen nach 34,8 Tagen. Im dritten Ansatz verlängerte sich diese Periode auf 48,1 Tage, um im 4. Ansatz auf 44,3 Tage abzunehmen. Die Standardabweichung dieser Werte in der Reihenfolge der Ansätze 1-4 beträgt 15,7, 25,1, 29,2 sowie 13,1 Tage.

Der mehrmalige Besatz hatte keinen nennenswerten Einfluß auf die durchschnittliche Ovipositionsdauer. So benötigten die Weibchen des ersten Ansatzes 22 Tage bis zum Ovipositionsbeginn, im zweiten und 3. Ansatz 1,6 Tage weniger; im vierten war die Dauer der Oviposition wieder nahezu so lang wie im ersten Ansatz. Nur 1 Rind zeigte im 2. Ansatz eine Erniedrigung um 3,7 Tage, die jedoch zum 4. Ansatz wieder anstieg (Abb. 2).

Das mittlere Gewicht der Eigelege nimmt im Verlauf der 4 Ansätze deutlich ab. So beträgt die Verminderung des Gewichtes vom 1. Ansatz mit 0,4248 g zum zweiten Ansatz mit 0,276 g 35%. Die Gelege des 3. Ansatzes sind um weitere 6,5% leichter, beim 4. Ansatz wogen die Gelege nur noch 53,6% des Gewichtes des ersten Ansatzes.

Von den abgefallenen repleten Weibchen legten im ersten Ansatz 110, im zweiten 128, im dritten 161 und im vierten Ansatz 112 Eier ab. Auf den Eiproduktionsindex nach ACKERMANN und Mitarb. (1980) macht sich ein negativer Einfluß des mehrmaligen Besatzes bemerkbar. Bis zum 4. Ansatz ist die prozentuale Eiproduktionsrate von 44,3% auf 37,1% gesunken.

Der Schlupf der ersten Larven aus den Gelegen begann 4,8 Tage nach Ovipositionsende und fiel, nach einer geringfügigen Verzögerung von 1,5 Tagen beim 3. Ansatz, beim 4. Ansatz wieder auf den Ausgangs-

wert zurück (Abb. 3). Allerdings waren hierbei die Standardabweichungen aller Ansätze hoch. Sie betrugen vom 1.-4. Ansatz 5.2, 4.6, 4.5 und 4.0 Tage.

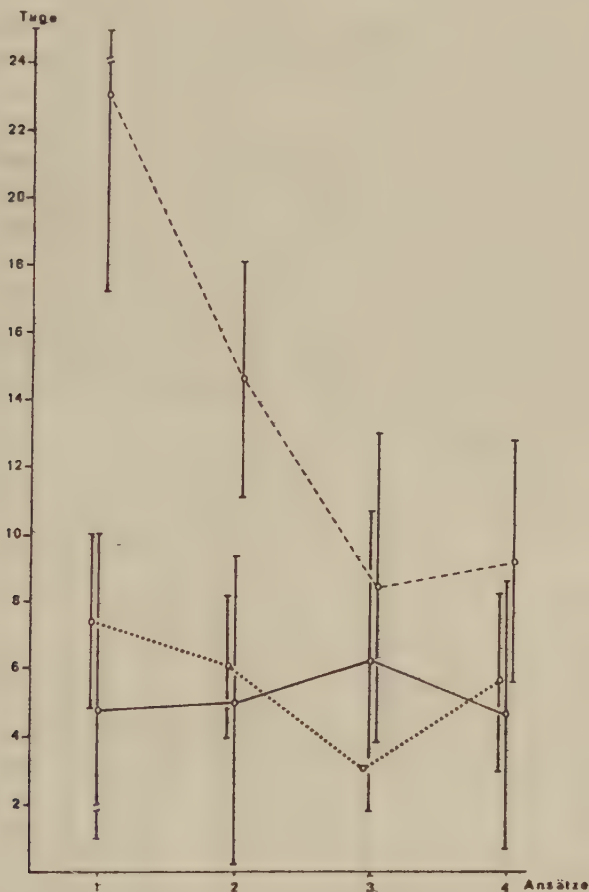


Abb. 3: Schlupfbeginn von *R. appendiculatus*, *Hyalomma a. excavatum* und *A. variegatum* im Verlauf von 4 Ansätzen (Durchschnittswerte von jeweils 3 Rindern)

- *R. appendiculatus*
- *Hyalomma a. excavatum*
- *A. variegatum*

c) Amblyomma variegatum

Die Ausbeute der vollgesogenen Weibchen war im Gegensatz zu *R. appendiculatus* und *H. a. excavatum* relativ hoch; auch war der augenscheinliche Füllzustand bei allen Ansätzen gleich gut. Der mehrmalige Besatz hatte kaum einen Einfluß auf die Abfallrate. So fielen im 1. Ansatz 91,3, im zweiten 88, im dritten 83,3 sowie im vierten Ansatz 90,6% der 150 auf drei Kälber verteilten Paare ab. Die Verteilung der Gewichtsklassen (Tab. 6) läßt keinen Bezug zur Besatzhäufigkeit erkennen. Auffällig ist, daß Zecken mit einem Abfallgewicht von 0,001 - 1,0g nur im 1. und 2. Ansatz mit je 0,7% vertreten sind. Weibchen, die zwischen 1,001 und 2,0g wiegen, machen 5,1% des ersten Ansatzes aus (Tab. 6); beim zweiten sind keine Zecken dieser Größenordnung, beim dritten 0,8% und beim 4. Ansatz 2,2% abgefallen.

Gewicht (g)	Ansatz							
	1		2		3		4	
	Zahl	%	Zahl	%	Zahl	%	Zahl	%
0,001 - 1,0	1	0,7	1	0,7				
1,001 - 2,0	7	5,1			1	0,8	3	2,2
2,001 - 3,0	34	24,8	13	9,9	11	8,8	11	8,1
3,001 - 4,0	63	46,0	53	40,2	48	38,4	47	34,5
4,001 - 5,0	32	23,5	51	38,6	54	43,2	49	36,0
5,001 - 6,0			12	9,1	11	8,8	25	18,4
6,001 - 7,0			1	0,7			1	0,8
7,001 - 8,0								
8,001 - 9,0			1	0,7				
Gesamt	137		132		125		136	

Tab. 6: Zuordnung repleter *Amblyomma variegatum*-Weibchen zu Gewichtsklassen und prozentualer Verteilung (Summierte Werte von 3 Rindern)

Die im ersten Ansatz größte Gruppe von 2,001 - 4,0 g mit 70,8% verringerte sich mit zunehmender Besatzhäufigkeit auf 50,1 im zweiten, 47,2 im dritten sowie 42,6% im vierten Ansatz. Dagegen stieg die Gewichtsklasse 4,001 - 5,0 g von 23,5% im ersten Ansatz über 38,6% im zweiten auf 43,2% im dritten Ansatz. Die Beteiligung der Klasse von 5,001 - 6,0 g an der Gesamtabfallmenge beginnt erst beim 2. Ansatz mit 9,1%, geht beim dritten auf 8,8% zurück und steigt beim 4. Ansatz auf 18,4% an.

Die Irritation der Wirtstiere durch die Zecken war bei *A. variegatum* wesentlich geringer als bei den anderen Zeckenarten; es konnten keine zerquetschten vollgesogenen Weibchen aufgefunden werden.

Die Saugdauer betrug durchschnittlich 10 bis 11,8 Tage und wurde durch den mehrmaligen Besatz nicht wesentlich beeinflusst (Abb. 1). Die Standardabweichung nahm vom 1. Ansatz mit 1,1 Tagen, 1,4 und 1,7 Tagen beim 2. und 3. Besatz auf 6,3 Tage im 4. Ansatz zu (Abb. 1).

Die Durchschnittswerte der Abfallgewichte aller Zecken eines Ansatzes ergaben im Vergleich zu 3,3485g im ersten Ansatz eine Steigerung um 23,2% auf 4,1252 g im vierten Ansatz. Vom 1. zum 2. Ansatz betrug die Gewichtszunahme bereits 20,6%.

Ansatz	n	$\bar{x}$	s
1	137	3,3485	0,8084
2	132	4,0379	0,8881
3	125	4,0207	0,776
4	136	4,1252	0,9233

Tab. 7: Abfallgewichte von *A. variegatum*-Weibchen im Verlauf von 4 Ansätzen (Durchschnittswerte von 3 Rindern)

Ebenfalls eine Zunahme ist bei den Standardabweichungen zu beobachten. 0,8084 g - 0,9233 g vom ersten zum vierten Ansatz beträgt die Abweichung.

Der mittlere Zeitraum von Abfalltag bis Ovipositionsbeginn, der bei den Weibchen des 1. Ansatzes 9,9 Tage betrug, war nur nach dem 2. und 3. Besatz leicht verkürzt und stieg beim 4. Besatz wieder auf den Ausgangswert an (Abb. 4). Die Standardabweichungen variierten von 1,3 - 2,2 Tagen im 2. und 1. Ansatz. Die Abweichungen der Ansätze 3 und 4 lagen mit 1,7 und 1,8 Tagen dazwischen. Zecken, die keine Eier legten, traten nur sehr vereinzelt auf; sie hatten verklebte Geschlechtsöffnungen und starben nach 2 - 3 Wochen.

Im Vergleich zur durchschnittlichen Ovipositionsdauer des ersten Ansatzes mit 24,4 Tagen, legten die Weibchen des 3. Ansatzes über 38,6 Tage hinweg Eier. Es waren jedoch auch bei Ansatz 2 und 4 mit 31,5 und 34,7 Tagen jeweils Verlängerungen von 7,1 und 10,3 Tagen festzustellen. Die Standardabweichungen bewegten sich zwischen 3,1 und 5,3 Tagen.

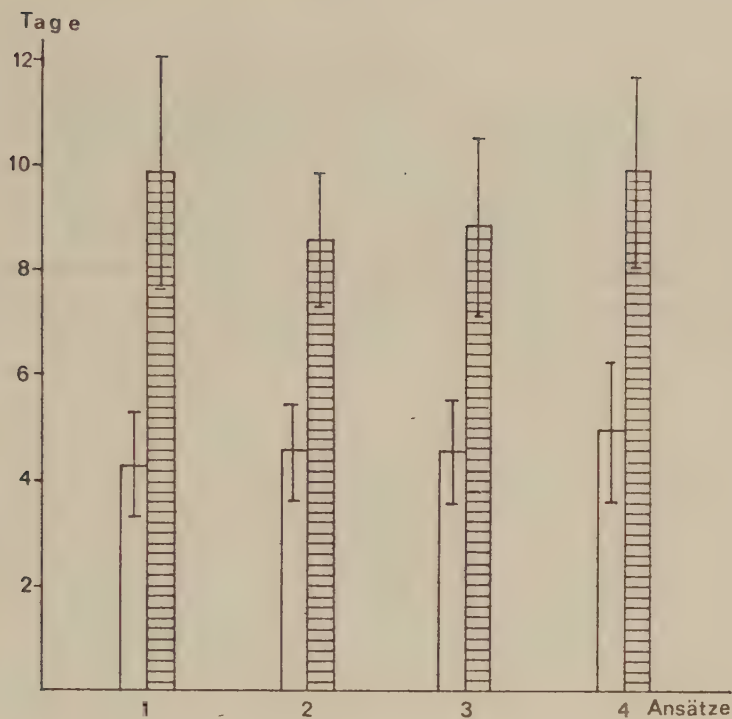


Abb. 4: Präovipositionsdauer von *Rhipicephalus appendiculatus* und *Amblyomma variegatum* im Verlauf von 4 Ansätzen (Durchschnittswerte von jeweils 3 Rindern)

 *R. appendiculatus*
 *A. variegatum*

Das Durchschnittsgewicht der abgelegten Eier blieb, abgesehen von einigen Schwankungen, nahezu unverändert. Im ersten Ansatz betrug das mittlere Gewicht 1,517 g, im 2. Ansatz 1,57 g, im 3. fiel es auf 1,4603 g ab und erhöhte sich im 4. Ansatz auf 1,5726 g. Die Standardabweichung bewegte sich zwischen 0,4012 und 0,5105 g. Der prozentuale Anteil des Gelegegewichts, ausgedrückt als Eiproduktionsindex (ACKERMANN und Mitarb., 1980), am Abfallgewicht der Zecken fiel von 45,3% im ersten Besatz auf 38,8% im zweiten und 36,3% im dritten. Beim 4. Besatz stieg es auf 38,1% an.

Die durchschnittliche Zeitspanne von Ovipositionsende bis zum Schlupf der ersten Larven verkürzte sich vom ersten zum 2. Ansatz von 23,1 auf 14,7 Tage; eine weitere Verkürzung auf 8,5 Tage war beim 3. Besatz festzustellen. Beim 4. Ansatz erhöhte sich dieser Wert wieder geringgradig auf 9,3 Tage (Abb. 3). Somit ist die Embryonalphase der Gelege vom 4. Ansatz deutlich kürzer als derjenigen vom 1. Besatz. Der Anteil der vertrockneten Gelege an der Gesamtzahl der geschlüpften Gelege betrug vom 1. - 4. Ansatz 9,2, 8,5, 25 und 18,9%

2. Serologische Untersuchungen mit dem ELISA

a) Rhipicephalus appendiculatus

Die Seren der Kälber Nr. 1-3, die am 1., 15., 29. und 43. Versuchstag mit Adulten besetzt worden waren, wurden bei einer konstanten Verdünnung von 1:100 mit dem ELISA auf ihren Antikörpergehalt untersucht. Dabei reagierten die Tiere fast gleich (Abb. 5).

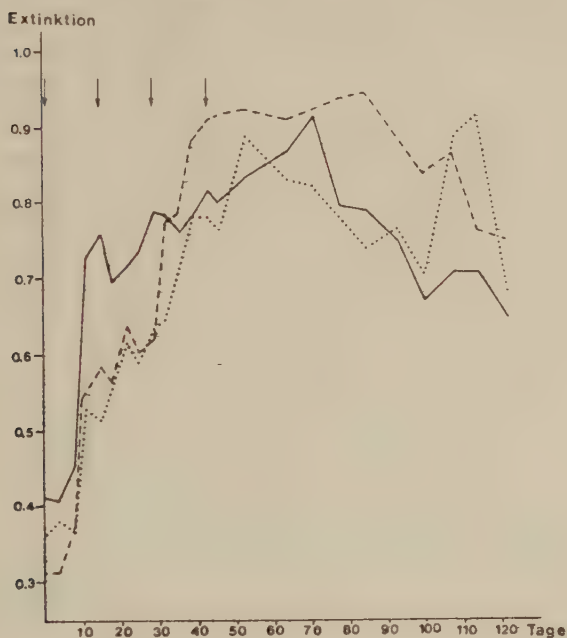


Abb. 5: Extinktionswerte der Seren von 3 mit *R. appendiculatus* 4 mal infestierten Rindern (Die Pfeile kennzeichnen die 4 Ansätze)

- Rind Nr. 1
- - - Rind Nr. 2
- Rind Nr. 3

Schon nach dem 1. Besatz, am 11. Versuchstag, stiegen die Extinktionswerte bei den Rindern um 0.35-0.65 nm. Auch die 2. Infestation vom 15. Tag wirkte sich ab dem 22. Tag wieder deutlich aus. Die höchsten Extinktionswerte wurden bei den zwischen dem 53. und 85. Versuchstag entnommenen Seren gemessen. Nach dem Abfall der Antikörperkonzentrationen um den 100. Tag stiegen sie abermals an; nur das Rind Nr. 3 erreichte die Maximalwerte wieder. Allgemein aber fielen die Werte dann kontinuierlich ab und glichen bei Versuchsende denjenigen nach dem 1. und 2. Besatz.

b) Hyalomma a. excavatum

3 Tage nach dem ersten Ansatz gingen die Antikörperreaktionen gegenüber den Ausgangswerten etwas zurück; allerdings stiegen sie dann bis zum 47. Tag um Extinktionen von 0,6-0,8 an (Abb. 6).

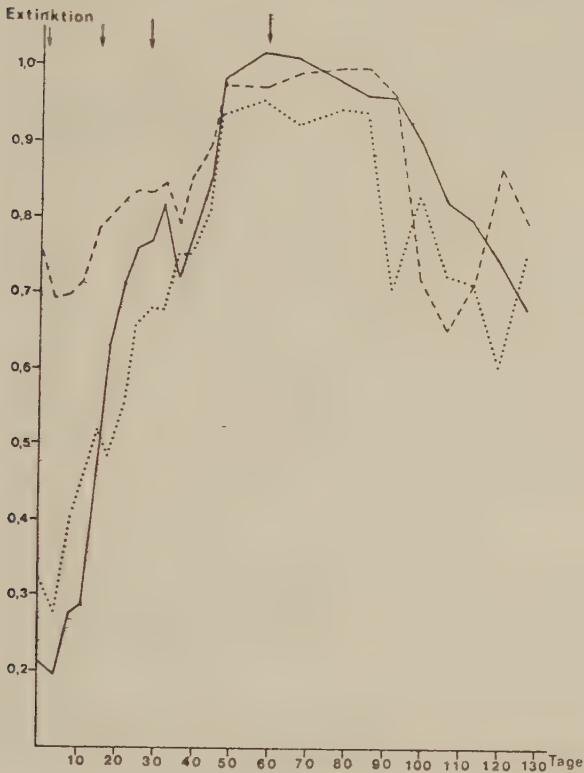


Abb. 6: Extinktionswerte der Seren von 3 mit *Hyalomma a. excavatum* 4 mal infestierten Rindern (Die Pfeile kennzeichnen die 4 Ansätze)

- Rind Nr. 4
- Rind Nr. 5
- Rind Nr. 6

Rind Nr. 6 bildete hierin eine Ausnahme; der Kontrollwert dieses Tieres lag bereits um 0,4 höher als derjenige der anderen.

Nach Erreichen der höchsten Antikörperkonzentrationen, am 92. Tag gemessen, gingen diese allmählich bei allen Tieren zurück. Bei Versuchsende am 127. Tag Versuchstag wies lediglich das Rind 4 nochmals einen Anstieg auf.

c) Amblyomma variegatum

Im Gegensatz zu den Reaktionen auf die mehrfachen Besätze mit *R. appendiculatus* und *H. a. excavatum* kam es bei dieser Zeckenart zu einem zweigipfligen Antikörperanstieg von 0,2-0,4 (Abb. 7). Das erste Maximum war am 15. Tag, der zweite Peak bei 2 Rindern am 43. Versuchstag erreicht. Beim Rind Nr. 8 kam es zu der zweiten Erhöhung erst am 65. Tag.

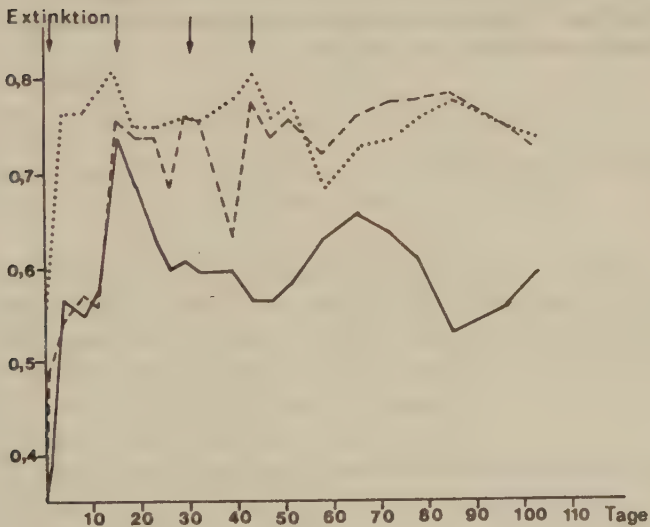


Abb. 7: Extinktionswerte der Seren von 3 mit *A. variegatum* 4 mal infestierten Rindern (Die Pfeile kennzeichnen die 4 Ansätze)

- Rind Nr. 7
- Rind Nr. 8
- Rind Nr. 9

Allgemein läßt sich für *R. appendiculatus* und *H. a. excavatum* sagen, daß Rinder nach Zeckenbesatz immunologisch reagieren und Antikörper gegen Zeckenspeichel bilden. Ein mehrfacher Besatz scheint die Antikörperbildung im Sinne eines Boostereffektes zu verstärken. 1-2 Monate nach der letzten Infestation sinkt der Antikörperspiegel im Serum wieder ab.

Bei einem Besatz mit *A. variegatum* wird eine Antikörperbildung stimuliert; die Antikörperkonzentration im Serum hat nach 14 Tagen ihr Maximum erreicht und wird durch Mehrfachbesatz nicht verstärkt. Auch bleibt der Serumantikörperspiegel, gemessen an den Extinktionswerten, deutlich unter denen der mit *Rhipicephalus* und *Hyalomma* infestierten Tiere. Außerdem persistiert die Konzentration im Serum auf niedrigerem Niveau, aber länger.

3. Intrakutantest

a) Rhipicephalus appendiculatus

Nachdem 8 Wochen zuvor die Zecken des letzten Besatzes von den Tieren abgefallen waren, injizierte ich 2 Kälbern jeweils 0,1 ml der 6 verschiedenen Speicheldrüsenantigene von *R. appendiculatus* sowie ihre 1:10 Verdünnungen mit Aqua dest. intrakutan. Die Antigene hatten unterschiedliche Proteinkonzentrationen (Tab. 8).

Saugdauer (Tage)	1/2	1	2	3-5	6-8	σ
Proteinkonz. mg/ml	0,12	0,068	0,115	0,268	0,108	0,142

Tab. 8: Speicheldrüsenantigene von *R. appendiculatus* mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen

Bereits wenige Minuten nach der Injektion traten Erytheme und ödematöse Schwellungen auf. Sie erreichten nach 30 Minuten ihr Maximum und blieben bis zu 1 Stunde sichtbar. Dabei reagierten bei Rind Nr. 1 sämtliche Injektionsstellen mit Ausnahme der Kontrolle, bei Rind Nr. 2 auch die Kontrolle; bei den Antigenen der 12 und 24 Stunden gesogenen Zecken traten keine Reaktionen auf.

Die nach 30 Minuten mit dem Kutimeter gemessene Hautdickenzunahme betrug bei Rind 1 durchschnittlich 0,35 cm ($s=0,08$) und bei Rind 2 0,28 cm ($s=0,09$) im Vergleich zu den Normalwerten, die als Kontrollmessung vor Testbeginn ermittelt wurden. Es lagen alle Injektionsstellen im positiven Bereich über 0,2 cm, mit Ausnahme derjenigen bei Rind 2, welche keine Reaktionen zeigten.

Die Messung nach 24 Stunden ergab bei Rind 1 eine positive Reaktion mit den Antigenen (3-5 und 6-8 Tage), sie waren jedoch gegenüber der Sofortreaktion deutlich vermindert. Alle übrigen Injektionsstellen hatten wieder nahezu ihre normale Hautdicke erreicht. Bei den

weiteren Messungen nach 48, 72 sowie 96 Stunden war bei den Rindern keine positive Reaktion mehr festzustellen.

b) Hyalomma a. excavatum

Dieser Versuch fand 8 Wochen nach dem vierten Besatz an 3 Rindern (Nr. 4-6) statt. Dabei wurden ebenfalls 6 Speicheldrüsenantigene und ihre Verdünnungen im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (Tab. 9) getestet.

Saugdauer (Tage)	1/2	1	2	3-5	6-8	♂
Proteinkonz. mg/ml	0,157	0,207	1,042	2,437	4,22	0,264

Tab. 9: Speicheldrüsenantigene von Hyalomma a. excavatum mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen

Die auftretenden Reaktionen variierten von Rind zu Rind.

Bei Rind Nr. 4 reagierten alle Injektionsstellen mit Ausnahme der Kontrollen. Die nach 30 Minuten erfolgten Messungen ergaben Hautdickenzunahmen von durchschnittlich 0,52 cm ($s=0,26$). Bei Rind Nr. 5 ergaben die Messungen nach 30 Minuten eine durchschnittliche Zunahme von 0,33 cm ($s=0,1$). Die Kontrolle sowie die Probe 48 Std. blieben mit 0,19 und 0,18 cm Hautdickenzunahme nur wenig unter der positiven Grenze. Rind Nr. 6 reagierte auf die Kontrolle stark mit 0,49 cm ($s=0,15$); bei den Proben 24 Stunden dagegen waren keine Zunahmen zu verzeichnen.

Nach 24 Stunden waren bei Rind Nr. 4 sämtliche Werte zurückgegangen, wobei die 12 und 48 Std.-Proben verdünnt nur wenig über 0 lagen (Tab. 10). Durchschnittlich betrug hier die Zunahme gegenüber der Kontrollmessung vor dem Versuch 0,26 cm ($s=0,21$).

Im Gegensatz dazu betrug bei Rind Nr. 5 die mittlere Zunahme

noch 0,16 cm ($s=0,17$), wobei nur noch die 3-5 und die 6-8 Tage-
Probe im positiven Bereich lagen.

Antigen	Hautdickenzunahme (cm) nach				
	30 Min.	24 h	48 h	72 h	96 h
Aqua dest.	0	0	0	0	0
12 h	0,49	0,06	0	0	0
12 h 1:10	0,16	0	0	0	0
24 h	1,00	0,65	0,50	0,55	0,53
24 h 1:10	0,80	0,37	0,35	0,24	0,28
48 h	0,20	0	0,13	0	0
48 h 1:10	0,23	0,01	0	0	0
3.-5. Tg	0,40	0,27	0,09	0,17	0,03
3.-5. Tg 1:10	0,72	0,50	0,33	0,29	0,20
6.-8. Tg	0,57	0,42	0,33	0,25	0,15
6.-8. Tg 1:10	0,38	0,20	0,12	0,08	0,06
σ^*	0,58	0,27	0,13	0,16	0,10
σ^* 1:10	0,76	0,31	0,23	0,24	0,16
n	12	12	12	12	12
$\bar{x}$	0,52	0,26	0,18	0,17	0,13
s	0,26	0,21	0,16	0,16	0,16

Tab. 10: Ergebnisse des Intrakutantests bei Rind Nr. 4 etwa 8
Wochen nach dem vierten Besatz mit *Hyalomma a. excavatum*.

Rind Nr. 6 zeigte ebenfalls einen Abfall der Hautdickenzunahme
nach 24 Stunden. Die Proben 12 Std., 3-5 Tage verdünnt und Männ-
chen waren auf nahe 0 abgesunken. Die Durchschnittszunahme betrug
0,18 cm ($s=0,17$).

Die Messungen nach 48 Stunden ergaben einen weiteren allmählichen Rückgang der Hautdicke. Bei Rind Nr. 4 betrug die Zunahme 0,18 cm ($s=0,16$). Andere Antigenproben waren negativ. Derselbe Durchschnittswert war auch nach 72 Stunden anzutreffen.

Auch bei Rind Nr. 5 blieben nach 48 Stunden die Zunahmen unter den vorher gemessenen Werten mit Ausnahme der Probe 24 Std., die wieder auf 0,2 cm angestiegen war. Ebenfalls noch positiv blieben die Proben 3-5 Tage und 6-8 Tage. Die mittlere Zunahme betrug 0,11 cm ($s=0,12$). Nach 72 Stunden wurde eine mittlere Zunahme von 0,09 cm ($s=0,1$) gemessen. Die einzige positive Reaktion der Probe 6-8 Tage blieb mit 0,34 cm nahezu unverändert. Bei Probe 3-5 Tage trat ebenfalls wieder eine positive Reaktion (0,30 cm) auf.

Die Hautdickenmessung nach 48 Stunden bei Rind Nr. 6 ergab ein völlig anderes Bild. Sowohl die Kontrolle als auch die anderen Werte, die bei der vorhergehenden Messung positive Reaktionen gezeigt hatten, blieben positiv. Der Mittelwert der Hautdickenzunahme betrug 0,18 cm ($s=0,15$). Nach 96 Stunden waren, ebenso wie die Kontrolle, noch verschiedene Proben positiv. Im Mittel lag die Hautdickenzunahme hier bei 0,14 cm ($s=0,11$).

c) Amblyomma variegatum

Auch hier wurde der Intrakutantest mit 6 Speicheldrüsenantigenen an 3 Rindern (Nr. 7-9) 4 Wochen nach der letzten Infestation durchgeführt. Die jeweiligen Proteinkonzentrationen sind in Tab. 11 dargestellt.

Saugdauer (Tag)	1/2	1	2	3-5	6-8	♂
Proteinkonz. mg/ml	0,233	0,245	0,883	1,042	2,899	0,875

Tab. 11: Speicheldrüsenantigene von *A. variegatum* mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen

Die nach der Injektion aufgetretenen Reaktionen fielen weitaus weniger heftig aus als *R. appendiculatus* und *H. a. excavatum*. Bei Rind Nr. 7 hatten nach 30 Minuten 4 Proben über 0,2 cm Hautdickenzunahme. Es handelte sich um die Proben 48 Std., 3-5 Tg., 6-8 Tg. und die Verdünnung letzterer. Durchschnittlich lag die Zunahme mit 0,18 cm ($s = 0,08$) nur knapp unter dem positiven Bereich. Alle weiteren Hautdickenmessungen zeigten durchschnittliche Zunahmen von 0,06 - 0,03 cm.

Rind Nr. 8 hatte nach 30 Minuten bereits Hautdickenzunahmen von 0,22 bis 0,44 cm (Tab. 12). Nach 48 Std. wurde erneut gemessen und die Probe 6-8 Tg. für positiv befunden. Durchschnittlich lag jedoch die Hautdickenzunahme bei 0,07 cm ($s = 0,06$). Bei späteren Messungen ließen sich nur noch Zunahmen von 0,05 - 0,06 cm feststellen, die vernachlässigt werden konnten.

Antigen	Hautdickenzunahme (cm) nach				
	30 Min	24 h	48 h	72 h	96 h
Aqua dest.	0,07	0	0,04	0,03	0,01
12 h	0,12	0,03	0,04	0,03	0
12 h 1:10	0,07	0	0,03	0,01	0
24 h	0,22	0,09	0,12	0,06	0,06
24 h 1:10	0,25	0,09	0,05	0,02	0,01
48 h	0,26	0,06	0,07	0,03	0,05
48 h 1:10	0,25	0	0,02	0,01	0
3-5 Tg	0,26	0,11	0,12	0,09	0,08
3-5 Tg 1:10	0,24	0,08	0,03	0,04	0,03
6-8 Tg	0,43	0,21	0,22	0,13	0,14
6-8 Tg 1:10	0,31	0,06	0,09	0,03	0,05
♂	0,44	0,11	0,10	0,10	0,08
♂ 1:10	0,19	0,03	0,05	0,04	0,05
n	12	12	12	12	12
$\bar{x}$	0,25	0,07	0,08	0,05	0,05
s	0,11	0,05	0,06	0,04	0,04

Tab. 12: Ergebnisse des Intrakutantests bei Rind Nr. 8 etwa 4 Wochen nach dem vierten Besatz mit *Amblyomma variegatum*

Rind Nr. 9 wies ebenfalls nach 30 Minuten Zunahmen auf; durchschnittlich 0,24 cm ($s=0,05$). Nach 24 Stunden verblieb nur noch die Probe Männchen verdünnt positiv. Der durchschnittliche Wert lag bei 0,06 cm ($s=0,09$) Bei den späteren Messungen waren alle Hautdicken wieder nahezu auf die Normalwerte gesunken.

4. Passiver kutaner Anaphylaxie-Test

6 Mäusen verabreichte ich 2 Tage nach der intradermalen Applikation von 6 Testseren pro Maus jeweils eines der 6 Speicheldrüsenantigene von R. appendiculatus. Die Tiere färbten sich schon während der intravenösen Injektion des Evans-blue-Antigengemisches besonders an den Schleimhäuten leicht bläulich. Die Injektionsstellen zeigten dagegen nach 30 und 60 Minuten ebensowenig Veränderungen wie die Hautinnenseite nach Tötung der Tiere.

Zur Testung der Speicheldrüsenantigene von H. a. excavatum wurden Mäusen ebenfalls 6 Antigengruppen intravenös injiziert. 30 und 60 Minuten später ließen sich ebenfalls keine Verfärbungen an der Innenseite der Haut feststellen.

Im Gegensatz dazu konnte ich bei der Ziege, die Speicheldrüsenantigen von H. a. excavatum mit einer Proteinkonzentration von 4,22 mg/ml erhalten hatte, bei den Seren vom 44. und 71. Versuchstag, die 48 Stunden vorher intrakutan appliziert worden waren, eine kräftig bläuliche Verfärbung der Haut mit Ausmaßen von 17 x 20 mm bei 44 Tg. und 32 x 28 mm bei 71 Tg. feststellen. Bei dem Serum vom 71. Versuchstag, das 24 Stunden vorher injiziert worden war, trat eine Verfärbung von 6 x 11 mm auf, welche bis zum nächsten Tag unverändert blieb. Alle übrigen Felder zeigten keine Reaktion.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Die nach mehrmaligem Besatz von Rindern auftretende zunehmende Sensibilisierung hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die Zecken und die Reaktionslage der Rinder.

Während bei *Rhipicephalus appendiculatus* die Anzahl der vollgesogenen Weibchen beim 4. Ansatz erheblich verringert war, konnte ich bei *Hyalomma a. excavatum* und *Amblyomma variegatum* keine wesentliche Änderung feststellen. BRANAGAN (1974), der die verschiedenen Stadien von *R. appendiculatus* untersuchte, fand ebenfalls eine reduzierte Abfallmenge nach aufeinanderfolgenden Infestationen.

Auch ROBERTS und KERR (1976) erreichten bei *Boophilus microplus*, die an bereits vorher exponierten Rindern und an Empfängern von Serum resistenter Tiere gesaugt hatten, eine geringere Abfallrate; sie führten diese auf eine gewisse Immunität der Tiere zurück. Andere Beobachtungen machte FUJISAKI (1978) mit *Haemaphysalis longicornis* an Kaninchen; er hält eine Beeinflussung vollgesogener Zecken durch immunologische Reaktionen nicht für möglich.

Eine Abnahme des Abfallgewichtes mit zunehmender Besatzhäufigkeit beobachtete ich bei *R. appendiculatus* und *Hyalomma a. excavatum*. Dagegen schienen *A. variegatum*-Weibchen geringfügig schwerer zu sein. WAGLAND (1978 a) stellte ebenfalls eine Abnahme des mittleren Abfallgewichtes bei Weibchen von *Boophilus microplus* an Rindern ebenso wie BROSSARD (1977) bei *Ixodes ricinus* an infestierten Kaninchen fest. Ähnliche Ergebnisse berichten RUBAIRE-AKIKI und MUTINGA (1980), die *R. appendiculatus* mehrmals an Kaninchen ansetzten.

Die von einigen Autoren beschriebene Verlängerung der Saugdauer konnte ich nicht bestätigen. Zwar wiesen die drei Zeckenarten geringfügige Schwankungen zwischen den einzelnen Ansätzen auf, doch läßt sich daraus keine deutliche Immunität ableiten.

Auch der Ovipositionsbeginn wurde weder bei *R. appendiculatus* noch bei den anderen 2 Zeckenarten durch die Besatzhäufigkeit beeinflusst. Ähnliches beobachteten DITTRICH (1980) bei Weibchen von *Rhipicephalus*

appendiculatus und *Hyalomma impressum* sowie FUJISAKI (1978) bei *Haemaphysalis longicornis*.

Ebensowenig zeigte die Ovipositionsdauer wesentliche Veränderungen im Verlauf der 4 Infestationen.

Eine Abnahme der Eigelegewichte zeigte sich bei *R. appendiculatus* und *H. a. excavatum* kontinuierlich während aller 4 Ansätze. Es besteht demnach eine Abhängigkeit vom Füllungszustand der Zecken.

Dies bestätigt analoge Befunde von DITTRICH (1980).

Bei vergleichender Betrachtung des Eiproduktionsindex fällt auf, daß *A. variegatum*- und *H. a. excavatum*-Weibchen einen geringeren Teil ihres Körpergewichtes in Eier umsetzten. ACKERMANN und Mitarb. (1980) beobachteten ein ähnliches Phänomen bei *Dermacentor variabilis* an Kaninchen und Ratten. Sie vermuten eine direkte Einwirkung der Antikörper auf die Eibildung.

Der Schlupfbeginn erfolgte bei *A. variegatum* wesentlich früher als bei *R. appendiculatus* und *H. a. excavatum*. Allerdings war diese Zeitspanne im ersten Ansatz etwa dreimal länger als bei den anderen. Es liegt die Vermutung nahe, daß hier ein Angriffspunkt der Wirtsabwehr liegen könnte.

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen mit dem ELISA lassen den Schluß zu, daß Rinder nach Zeckenbesatz mit *R. appendiculatus* und *H. a. excavatum* immunologisch reagieren. Ein mehrfacher Besatz scheint einen Boostereffekt auszulösen. Nach etwa 90 Tagen sank jedoch die Antikörperkonzentration wieder ab. Der hohe Ausgangswert von Rind Nr. 6 ist möglicherweise auf Zeckenkontakt vor dem Zukauf zurückzuführen. Es müßte sich in diesem Fall um eine Kreuzreaktion mit einer europäischen Zeckenart handeln.

Bereits KÖHLER und Mitarb. (1967) konnten mit der Immundiffusion mit homologen Speicheldrüsenantigenen von *H. a. excavatum* ab dem 2. Besatz in Seren von Kaninchen spezifische Antikörper nachweisen. FUJISAKI (1978) gelang der Antikörpernachweis ebenfalls, nachdem er *Haemaphysalis longicornis* an Kaninchen zweimal angesetzt hatte.

Die Konzentration nahm erst nach wiederholten Ansätzen zu. WIKEL und OSBURN (1982) konnten Präzipitine gegen Speicheldrüsenantigen nachweisen, obwohl sie nur 10 Weibchen von *Dermacentor andersoni* je Rind ansetzten.

Im Gegensatz zu den beiden anderen Zeckenarten reagierten Rinder auf *A. variegatum* im ELISA nur mit einem niedrigen Antikörperspiegel; auch ein wiederholter Besatz beeinflusste die Konzentration nicht. Offensichtlich enthält *A. variegatum*-Speichel weniger antigene Substanzen, als *R. appendiculatus* und *H. a. excavatum*, obwohl die ausgeschiedene Gesamtmenge wesentlich höher liegt. Es könnte sich aber auch um eine immunsuppressive Wirkung des Speichels handeln. Dies vermuteten auch WIKEL und OSBURN (1982), als sie nach dem 3. und 4. Besatz von Rindern mit *Dermacentor andersoni* eine verminderte Reaktion in der Hämagglutination feststellten.

Der bei den Rindern mit Speicheldrüsenantigenen von *R. appendiculatus*, *H. a. excavatum* und *A. variegatum* durchgeführte Intrakutantest induzierte bei allen Rindern eine Sofortreaktion. Diese beruht auf den durch den Kontakt des Antigens mit den IgE-Antikörpern aus den Mastzellen und basophilen Leukozyten freigesetzten vasoaktiven Aminen (FELLENBERG, 1978). Weitere Messungen ergaben bei *R. appendiculatus* nur noch geringe Reaktionen nach 24 Stunden. Bei *H. a. excavatum* blieben bei allen Rindern einige Werte nach 96 Stunden noch positiv; es handelt sich dabei um Antigene, die bereits nach 30 Minuten eine besonders hohe Hautdickenzunahme ausgelöst hatten.

Positive Reaktionen nach intrakutaner Injektion von *A. variegatum*-Speicheldrüsenantigen hatten niedrige Werte und waren nach 24 Stunden bereits verschwunden. Daran könnte auch die geringe Antigenität des Speichels dieser Zeckenart schuld sein.

Ebenfalls eine Sofortreaktion stellten WILLADSEN und WILLIAMS (1976) bei natürlich mit *Boophilus microplus* infestierten Rindern fest.

Die Stärke der Reaktion variierte von Tier zu Tier. WILLADSEN und Mitarb. (1978) sehen die Ursache für die unterschiedliche Reaktion einzelner Tiere darin, daß einige mehr pharmakologisch aktive Komponenten produzieren oder sensibler für diese während der Sofortreaktion freigesetzten Stoffe sind.

Eine Spätreaktion auf Speicheldrüsenantigen von *Dermacentor andersoni* stellten WIKEL und OSBURN (1982) bei Rindern 24 Stunden nach intrakutaner Verabreichung von 10 µg Speicheldrüsenantigen fest. Sie hatten jedoch nur 10 Weibchen pro Tier angesetzt; meine Infestationen wurden mit 100 bzw. bei *A. variegatum* mit 50 Weibchen durchgeführt. Es scheint die Menge der angesetzten Zecken ohne Einfluß auf die Ausbildung der Immunität zu bleiben.

Die negativen Ergebnisse des heterologen PCA-Tests bei Mäusen bestätigen die Vermutung von GERSHWIN (1980), daß bovines IgE nur bei verwandten Spezies eine kutane Anaphylaxie hervorruft. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, daß der bei der Ziege mit Speicheldrüsenantigen von *H. a. excavatum* durchgeführte PCA-Test bei zwei der intrakutan verimpften Rinderseren eine positive Reaktion zeigte. Interessant ist die Tatsache, daß diese Seren bei der serologischen Untersuchung mit dem ELISA auf IgG Maximalkonzentrationen aufwiesen.

Aus der vorliegenden Untersuchung geht hervor, daß Rinder nach mehrmaliger Infestation mit *Rhipicephalus appendiculatus* und *H. a. excavatum* eine gewisse Immunität entwickeln. Die während der Besätze, ausgenommen *A. variegatum*, beobachteten teilweise massiven Hautreaktionen beeinflussten insbesondere das Abfallgewicht und die Saugdauer der Zecken. Bei *A. variegatum* war nur eine reduzierte Eiablage festzustellen.

V. Zusammenfassung

Je 3 Rinder wurden mit adulten *Rhipicephalus appendiculatus*, *Hyalomma anatolicum excavatum* und *Amblyomma variegatum* viermal besetzt. Über 120 Tage wurden den Versuchstieren anfangs zweimal, später einmal wöchentlich Blutproben entnommen. Mit homologem Speicheldrüsenantigen erfolgten Untersuchungen im ELISA, 4-8 Wochen nach dem vierten Ansatz der Intrakutantest sowie ein heterologer PCA-Test.

Bei *R. appendiculatus* und *H. a. excavatum* kam es zu einer Verminderung der Abfallgewichte und der Eigelegegewichte. Der Eiproduktionsindex war bei *H. a. excavatum* und *A. variegatum* vermindert. Die serologische Untersuchung mit dem ELISA zeigte steigende Antikörperkonzentrationen bei *R. appendiculatus* und *H. a. excavatum*; diese hatten nach dem 4. Besatz ihre Maxima erreicht und sanken 1-2 Monate danach wieder ab; bei *A. variegatum* waren die Konzentrationen niedriger.

Im Intrakutantest kam es bei allen Tieren zu einer Sofortreaktion nach 30-60 Minuten. Der passive kutane Anaphylaxie-Test mit Speicheldrüsenantigen von *R. appendiculatus* und *H. a. excavatum* und Seren von Rindern versagte bei Mäusen, wurde aber positiv bei einer Ziege 24 und 48 Stunden nach der Serumverimpfung.

Rosenberg, R.: Humoral reactions in cattle following multiple infestation with *Rhipicephalus appendiculatus*, *Hyalomma anatolicum excavatum* and *Amblyomma variegatum* and its influence on tick development.

Summary:

Three cattle each were 4 times infested with adults of *Rhipicephalus appendiculatus*, *Hyalomma anatolicum excavatum* and *Amblyomma variegatum*. Serum samples were taken over a period of 120 days, at first twice, later once a week. Homologous salivary gland antigen was used for the serological investigations by means of the ELISA, for skin tests which were conducted 4 to 8 weeks after the 4th infestation and for a heterologous PCA-Test.

In *R. appendiculatus* and *H. a. excavatum* the drop off weights were reduced as well as the weights of the egg batches laid. The egg production index decreased in *H. a. excavatum* and *A. variegatum*. Serological investigations by means of the ELISA revealed rising antibody concentrations against *R. appendiculatus* and *H. a. excavatum*, which reached their maximums after the forth infestation and declined 1 to 2 months later. The antibody level against *A. variegatum* was lower.

All cattle showed only an immediate hypersensitivity reaction with in 30 to 60 minutes following the intradermal injection of antigen. The passive cutaneous anaphylaxis test failed in mice using salivary gland antigen of *R. appendiculatus* and *H. a. excavatum* and cattle sera, showed, however, a positive reaction in a goat against *H. a. excavatum* antigen 24 and 48 hours after injection of serum.

VI. Literaturverzeichnis

- Ackermann, S., M. Floyd, D.E. Sonenshine (1980): Artificial immunity to *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): Vaccination using tick antigens. *J. Med. Ent.* 17, 391-397
- Binnington, K.C. (1978): Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Int. J. Parasit.* 8, 97-115
- Binnington, K.C., B.F. Stone (1981): Developmental changes in morphology and toxin content of the salivary gland of the Australian paralysis tick *Ixodes holocyclus*. *Int. J. Parasit.* 11, 343-351
- Boese, J.L. (1974): Rabbit immunity to the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Ent.* 11, 503-512
- Bowensidjaou, J., M. Brossard, A. Aeschlimann (1977): Effects and duration of resistance acquired by rabbits on feeding and egg laying in *Ixodes ricinus* L. *Experientia* 33, 528-530
- Branagan, D. (1974) The feeding performance of the ixodid *Rhipicephalus appendiculatus* Neum. on rabbits, cattle and other hosts. *Bull. ent. Res.* 64, 387-400
- Brossard, M. (1977): Rabbits infested with the adults of *Ixodes ricinus* L.: Passive transfer of resistance with immune serum. *Bull. Soc. Path. Ex.* 3, 289-294
- Brossard, M., P. Girardin (1979): Passive transfer of resistance in rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L.: Humoral factors influence feeding end egg laying. *Experientia* 35, 1395-1396
- Brown, S.J. (1977): Feeding performance, survival and appearance of *Dermacentor variabilis* nymphs (Acari: Ixodidae) as influenced by host resistance. *J. Med. Ent.* 14, 497-498

- Centurier, C., R. Klima (1978/79): Ein Beitrag zur Kenntnis der Biologie von *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794). Z. ang. Ent. 87, 131-142
- Centurier, C., G. Weiland, S. Seubert (1981): Immunbiologische Untersuchungen zum Wirt-Parasit-Verhältnis zwischen Kaninchen und der Lederzecke *Ornithodoros moubata*. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 238-241
- Dittrich, L. (1980): Ein Beitrag zum Wirt-Parasit-Verhältnis zwischen Kaninchen, Schaf und Rind und den Schildzeckenarten *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann, 1901) und *Hyalomma impressum* (Koch, 1844). Vet. med. Diss., München
- Ernst, J. (1981): Untersuchungen über die Wirksamkeit von Ivermectin (MK-933) auf *Amblyomma variegatum*, *Hyalomma anatolicum excavatum* und *Rhipicephalus appendiculatus* am Rind. Vet. Med. Diss., München
- Fellenberg, R. (1978): Kompendium der allgemeinen Immunologie. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- Fujisaki, K. (1977): Development of acquired resistance and precipitating antibody in rabbits experimentally infested with females of *Haemaphysalis longicornis* (Ixodoidea: Ixodidae) Nat. Inst. Anim. Hlth Quart. 18, 27-38
- Gershwin, L.J. (1980): Heterologous passive cutaneous anaphylaxis with bovine immunoglobulin E. Am. J. Vet. Res. 42, 1184-1187
- Gfeller, W. (1971): Biologische, immunologische und histologische Untersuchungen als Beitrag zur Abklärung von Resistenzerscheinungen bei Kaninchen nach mehrmaliger Infestation mit der Zecke *Rhipicephalus bursa* (Canestrini und Fanzago, 1877). Vet. med. Diss., Bern
- Heller-Haupt, A. M.R.G. Varma, A.O. Langi (1981): Acquired resistance to ixodid ticks in laboratory animals. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 75, 147-148

- Köhler, G., G. Hoffmann, F. Hörchner, G. Weiland (1967): Immunbiologische Untersuchungen an Kaninchen mit Ixodiden-Infestationen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 80, 396-400
- Lutu, W. Z., (1982): Pyrexia in response to *Rhipicephalus appendiculatus* infestation in calves. Trop. Anim. Hlth Prod. 14, 37-43
- Rechav, Y., H.G. Kuhn, M.M. Knight (1980): The effects of the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) on blood composition and weight of rabbits. J. Med. Ent. 17, 555-560
- Roberts, R. A., J.D.Kerr(1976): *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. J. Parasitol. 62, 485-489
- Rubaire-Akiki, C.M., M.J. Mutinga (1980): Immunological reactions associated with rabbit resistance to *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann) infestations. Bull. Anim. Hlth Prod.Afr. 28, 49-59
- Wagland, B.M., (1978): Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. II. The dynamics of resistance in previously unexposed and exposed cattle. Aust. J. Agric. Res. 29, 395-400
- Weiland, G., C.I. Emokpare (1968): Zur Brauchbarkeit der Komplement-bindungsreaktion zum Antikörperrnachweis bei Zeckeninfestation. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 81, 15-16
- Wikel, S.K., J.E. Graham, J.R. Allen (1977): Skin reactivity and in vitro lymphocyte responsiveness to salivary gland antigen. Immunology 34, 257-263
- Wikel, S.K. (1981): Immune responsiveness of the bovine host to repeated low-level infestations with *Dermacentor andersoni*. Ann. Trop. Med. Parasit. 76, 405-414 14
- Wikel, S.K. (1981): The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. Am.J. Trop. Med. Hyg. 30, 284-288

- Willadsen, P., P.G. Williams (1976): Isolation and partial characterization of an antigen from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Immunochemistry* 13, 591-597
- Willadsen, P., P.G. Williams, J.A. Roberts, J.D Kerr (1978): Responses of cattle to allergens from *Boophilus microplus*. *Int. J. Parasit.* 8, 89-95.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. J. Boch danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und die Ermöglichung der Durchführung meiner Arbeit unter besten Bedingungen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. C. Centurier, der mich bei meiner Arbeit betreute und mir stets hilfreich mit Anregungen und Hinweisen zur Seite stand.

Meinen Dank möchte ich auch Fr. Renate Schmid für ihr stets gezeigtes Entgegenkommen und ihre technische Hilfe aussprechen.

Bei Herrn Dr. G. Weiland und seinen Mitarbeitern möchte ich mich herzlich für die Unterstützung bei den serologischen Arbeiten bedanken.

Lebenslauf

- 1956 Am 17.8. in München als Tochter des Kaufmanns Augustin Rosenberg und seiner Frau Hedwig Rosenberg, geb. Mandel geboren. Staatsangehörigkeit österreichisch.
- 1962-1970 Besuch der Grundschule und des Gymnasiums in München.
- 1970-1974 Besuch des Gymnasiums in Raanana/ Israel und Reifeprüfung im Frühjahr 1974.
- 1974-1975 Ab Wintersemester 1974/75 Studium der Forstwissenschaft an der Universität München.
- 1975-1981 Ab Wintersemester 1975/76 Studium der Tiermedizin in München und Staatsexamen im Dezember 1981.
Anschließend Anfertigung der Dissertation am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie in München.

